



B64

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 01212345 A

(43) Date of publication of application: 25.08.89

(51) Int. Cl.

G01N 27/30

(21) Application number: 63038166

(22) Date of filing: 19.02.88

(71) Applicant: MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

(72) Inventor: NANKAI SHIRO  
KAWAGURI MARIKO  
FUJITA MAYUMI  
IJIMA TAKASHI

## (54) PREPARATION OF BIOSENSOR

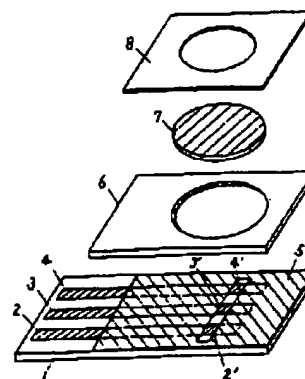
## (57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a disposable type biosensor excellent in response and preservability, by providing an electrode system on an insulating substrate by the printing carbon paste and applying polishing and surface treatment to the surface of said electrode system before forming a hydrophilic polymer layer to the surface thereof.

CONSTITUTION: Conductive carbon paste is printed on a substrate 1 composed of polyethylene terephthalate in a strip form by screen printing and dried under heating to form an opposed electrode 2, a measuring electrode 3 and a reference electrode 4. Next, insulating paste based on polyester covering the electrode system is printed so as to leave the acting parts 2'W4' of the respective electrode and heat-treated to form an insulating layer 5. Subsequently, the exposed parts 2'W4' are heat-treated at 100°C in air and an aqueous solution of carboxy methyl cellulose is developed on the electrodes to be dried. Next, a perforated holding frame 6 is bonded to the layer 5. Then, a solution prepared by dissolving glucose oxidase in a phosphate buffer solution is developed so as to cover the electrodes 2'W4' and dried to hold enzyme. Next, a porous body 7

supporting an electron acceptor is held to the hole of the frame 6 and a resinous cover 8 is bonded to integrate the whole.

COPYRIGHT: (C)1989,JPO&amp;Japio



## ⑫ 公開特許公報(A) 平1-212345

⑤ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成1年(1989)8月25日

G 01 N 27/30

J-7363-2G

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全5頁)

⑬ 発明の名称 バイオセンサの製造法

⑭ 特 願 昭63-38156

⑮ 出 願 昭63(1988)2月19日

⑯ 発 明 者 南 海 史 朗 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内  
 ⑯ 発 明 者 河 栗 真 理 子 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内  
 ⑯ 発 明 者 藤 田 真 由 美 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内  
 ⑯ 発 明 者 飯 島 孝 志 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内  
 ⑰ 出 願 人 松下電器産業株式会社 大阪府門真市大字門真1006番地  
 ⑱ 代 理 人 弁理士 中 尾 敏 男 外1名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

バイオセンサの製造法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 絶縁性の基板上に、カーボンペーストの印刷または塗布により少くとも測定極と対極からなる電極系を設け、ついでこの電極の表面を研磨し、熱処理した後に前記電極表面に親水性高分子層を形成し、前記基板を酸化還元酵素および電子受容体とともに一体化したことを特徴とするバイオセンサの製造法。

(2) 電極表面に形成した親水性高分子に酸化還元酵素および電子受容体を担持させ、基板とともに一体化する請求項1に記載のバイオセンサの製造法。

(3) 酸化還元酵素および電子受容体の両方あるいはいずれか一方を予め多孔体に担持した後に基板とともに一体化する請求項1に記載のバイオセンサの製造法。

(4) 酸素雰囲気中にて、60℃以上の温度で熱

処理を行なう請求項1に記載のバイオセンサの製造法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 産業上の利用分野

本発明は、種々の微量の生体試料中の特定成分について、試料液を希釈することなく迅速かつ簡単に定量することのできるバイオセンサの製造法に関する。

## 従来の技術

従来、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などの操作を行うことなく高精度に定量する方式としては、第5図に示す様なバイオセンサが提案されている(例えば、特開昭59-166852号公報)。このバイオセンサは、絶縁基板9にリード12、13をそれぞれ有する白金などからなる測定極10および対極11を埋設し、これらの電極系の露出部分を酸化還元酵素および電子受容体を担持した多孔体14で覆ったものである。試料液を多孔体上へ滴下すると、試料液に多孔体中の酸化還元酵素と電子受

客体が溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し電子受容体が還元される。酵素反応終了後、この還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき えられる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。

#### 発明が解決しようとする課題

このような従来の構成では、多孔体については測定毎に取り替えることにより簡単に測定できるが、電極系については洗浄等の操作が必要である。一方、電極系をも含めて測定毎の使い捨てが可能となれば、測定操作上、極めて簡易になるものの、白金等の電極材料や構成などの点から、非常に高価なものにならざるを得ない。また、従来の構成においては、電極上への液降下や電極面上の濡れが不均一となり、電極面上に気泡が残留するなどにより不安定な応答を示す場合がみうけられた。

#### 課題を解決するための手段

本発明は上記課題を解決するため、絶縁性の基板に、カーボンペーストの印刷または塗布などにより少なくとも測定極と対極からなる電極系を

測定極3、参照極4からなる電極系を形成する。次に、電極系を部分的に覆い、各々の電極の電気化学的に作用する部分となる2'、3'、4'（各1）を残すように、ポリエステル主体の絶縁性ペーストを前記と同様に印刷し、加熱処理をして絶縁層5を形成する。次に、露出した2'、3'、4'の各部分を研磨後、空气中で100℃にて4時間熱処理を施した。次に、親水性高分子として、カルボキシメチルセルロース（以下CMCと略す）の0.5wt%水溶液を電極上へ展開し、乾燥した。この後、穴を開けた樹脂性の保持枠6を絶縁層5に接着する。次に前記電極系2'、3'、4'を覆うように、酵素としてグルコースオキシダーゼをリン酸緩衝液に溶解した液を展開し、乾燥させ、酵素を担持する。ついで、電子受容体を担持した多孔体7を前記保持枠の穴の中に保持する。さらにこの多孔体の外径より小さい径の開孔部を有する樹脂性カバー8を接着し、全体を一体化する。なお、保持枠の取り付けや酵素層および親水性高分子層の形成については特に上記の順序に制限さ

ない。ついでこの電極の表面を研磨し、熱処理を施した後に、電極面上に親水性高分子層を形成し、前記基板を酸化還元酵素および電子受容体とともに一体化するものである。

#### 作用

本発明によれば、極めて容易に基質濃度を測定することができ、かつ、保存性に優れたディスプレイタイプのバイオセンサを構成することができる。

#### 実施例

以下、本発明の一実施例について説明する。

#### 実施例1

バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。第1図は、本発明のバイオセンサの製造法の一実施例として作製したグルコースセンサについて示したもので、構成部分の分解図である。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを平行な帯状に印刷し、加熱乾燥することにより、対極2、

れることはない。

上記一体化されたバイオセンサについて、測定極3に沿った断面図を第2図に示す。上記で用いた多孔体は、ナイロン不織布を素材とし、電子受容体としてのフェリシアン化カリウム400mgを、濃度0.025wt%の界面活性剤（ポリエチレングリコールアルキルフェニルエーテル）を含むPH5.6のリン酸緩衝液1mlに溶解した液を前記基材に含浸後、濃度0.025wt%の界面活性剤を含むエタノール中に浸漬して結晶化し、次に減圧乾燥して作成したものである。

上記のように構成したグルコースセンサの多孔体へ試料液としてグルコース標準液を滴下し、滴下2分後に参照極を基準にして700mVのバース電圧を印加することにより、測定極をアノード方向へ分極した。

添加された試料液は酵素、電子受容体さらにはCMCを溶解し粘稠な液体となりながら電極面上を速やかに拡がり、気泡の残留は認められなかった。これは、電極上に予め形成された親水性高

子層により電極面の濡れが向上したことによるものと考えられる。

一方、添加された試料液中のグルコースは電極上に担持されたグルコースオキシダーゼの作用で多孔体7に担持されたフェリシアン化カリウムと反応してフェロシアン化カリウムを生成する。そこで、上記のアノード方向へのパルス電圧の印加により、生成したフェロシアン化カリウム濃度に比例した酸化電流が得られ、この電流値は基質であるグルコースの濃度に対応する。

第3図は、上記構成になるセンサの応答特性の一例として、電圧印加10秒後の電流値と、グルコース濃度との関係を示すものであり、極めて良好な直線性を示した。上記に示したグルコースセンサの製造方法において、カーボン電極の研磨後の熱処理工程の温度を100℃、70℃、60℃、50℃及び熱処理なしとした以外は、前記とまったく同様に構成したセンサを各々複数個作製し、30℃にて保存し、前記グルコース標準液に対する応答変化を検討した。各々の熱処理温度の電極

を用いたセンサについて、初度の応答電流を100%としたときの変化を第4図に示す。図より明らかなごとく、処理温度60℃以上では保存にともなう応答変化は少ないが、50℃あるいは熱処理なしの場合には変動が大である。これは、研磨されたカーボン印刷電極の露出表面部分の活性が安定していないことによるものと推定される。なお、電極面を研磨しない場合には、研磨した場合の約1/3の応答電流しか得られなかったが、このような研磨の有無による応答電流の違いは、ペースト中にバインダーとして含まれる樹脂成分などがカーボン表面を部分的に被覆していることによるものと考えられる。しかし、研磨により、カーボン電極表面の樹脂バインダーの削除ならびに電極表面の平滑化が進むとともに、さらに熱処理することにより、電極露出部の活性度を安定化できるものと考えられる。

本発明者らの検討によれば、60～170℃の温度で酸素雰囲気中1～4時間以上熱処理することで、保存後における応答電流の変化が極めて少

ない、好結果が得られた。熱処理に際し、50℃以下では前述した通り好ましい結果は得られなく、又逆に170℃よりも高温での熱処理は、かえって応答感度の低下が見られた。これはカーボンペースト中の樹脂バインダーの変質をも含めたカーボン電極表面の劣化によるものとかんがえられる。

#### 実施例2

親水性高分子層を形成するまでの工程は実施例1と全く同様に行なった後、保持棒を用いず、グルコースオキシダーゼのリン酸緩衝液を電極面上へ展開し、乾燥した。次に、フェリシアン化カリウムを微粒化したものを有機溶媒に分散し、これを前記の酵素の担持面上へ展開の後、有機溶媒を蒸発させた。

上記の様にして得られた親水性高分子、酵素、および電子受容体を電極面上に担持したグルコースセンサについて、実施例1と同様にしてグルコース濃度に対する応答を測定したところ、濃度と電流値の間に良好な直線関係が得られた。

本発明のバイオセンサの製造法の電子受容体お

よび酸化還元酵素を一体化する場合の配置については、実施例1に示した様に、多孔体を用いて、いずれか一方または両方を多孔体に担持して絶縁性の基板とともに一体化すると、滴下された試料液は確実に多孔体上に展開され、かつ担持されている酵素あるいは電子受容体も速やかに溶解するため測定時間を短縮することができる。また実施例2に示した様に両方を親水性高分子とともに電極上に担持して一体化すると、保持棒などが不要になるなど構造的に簡単となり、製造上の利点が大い。

また一体化の方法としては、実施例に示した棒体、カバーなどの形や組合せに限定されるものではない。また、用いる多孔体としては、ナイロン不織布以外に、セルロース、レーヨン、セラミック、ポリカーボネートなどからなる多孔体を単独、あるいは組み合わせて用いることができる。さらに酸化還元酵素と電子受容体の組み合わせも前記実施例に限定されることはなく、本発明の主旨に合致するものであれば用いることができる。一方、

上記実施例においては、電極系として3電極方式の場合について述べたが、対極と測定極からなる2電極方式でも測定は可能であった。また、電極の形成において、カーボンペーストの導電性が低い場合には銀ペーストなどで予めリードを形成し、この上からカーボン電極を構成すれば良い。

吸水性高分子としてCMCの他にゼラチンやメチルセルロースなども使用でき、デンプン系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系のものが好ましい。これらの吸水性あるいは水溶性の親水性高分子を適当な濃度の溶液などとしたものを塗布、乾燥することにより、必要な膜厚の親水性高分子層を電極上に形成することができる。

なお、本発明のバイオセンサの製造法は上記実施例に示したグルコースセンサに限らず、アルコールセンサやコレステロールセンサなど、酸化還元酵素の関与する系に用いることができる。また、電子受容体としては、上記実施例に用いたフェリ

シアン化カリウムが安定に反応するので適しているが、キノン系やフェロセン系なども用いることができる。

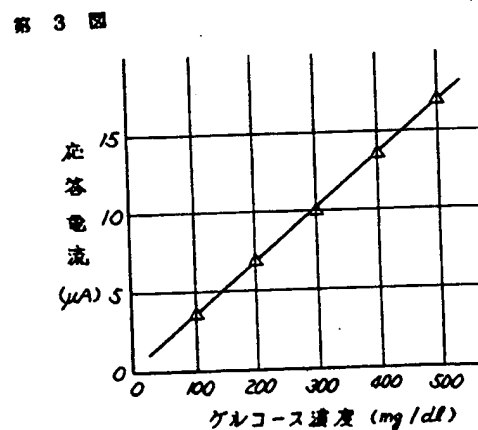
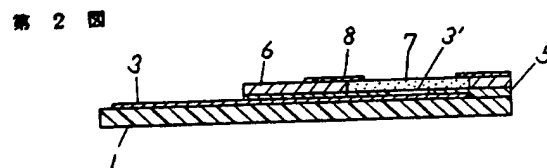
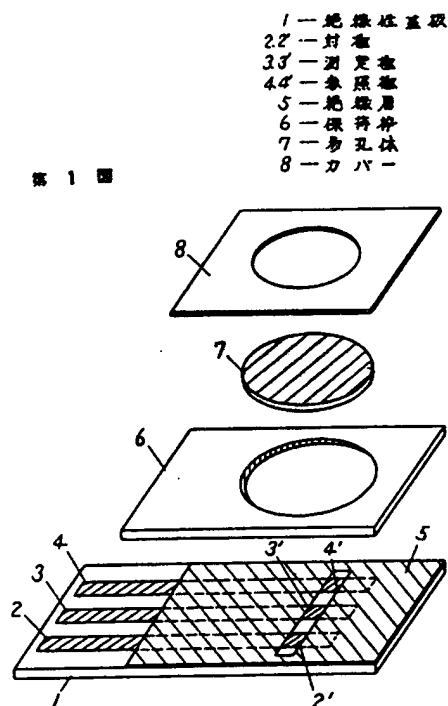
#### 発明の効果

以上のように本発明のバイオセンサの製造法は、カーボンを主体とする電極系に研磨、熱処理を施すことにより、応答性、保存性に優れたバイオセンサを提供することができる。

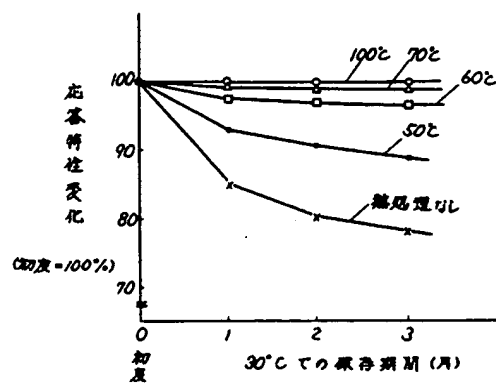
#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の一実施例であるバイオセンサの分解斜視図、第2図は同バイオセンサの縦断面図、第3図は同バイオセンサの応答特性図、第4図は同バイオセンサの保存特性図、第5図は従来例のバイオセンサの縦断面図である。

代理人の氏名 弁理士 中尾敏男 ほか1名



第 4 図



第 5 図

